

B:

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

## PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 270 382 A1

 4(51) G 01 N 33/52  
 G 01 N 33/68  
 C 12 G 1/56

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht:

(21)	WP G 01 N / 295 789 5	(22)	31.10.86	(44)	26.07.89
(71)	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Sektion Biowissenschaften, Domplatz 1, Halle, 4020, CD				
(72)	Neubert, Klaus, Dr. Dipl.-Chem.; Barth, Alfred, Prof. Dr. Dipl.-Chem.; Reichelt, Dieter, Dr. Dipl.-Chem.; Reichelt, Ingrid; Born, Ina, Dr. Dipl.-Chem., DD				
(54)	Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Dipeptidylpeptidase IV mittels Dipeptidhydraziden				

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Dipeptidylpeptidase IV (DP IV), das dadurch gekennzeichnet ist, daß vorzugsweise das Substrat Glycyl-L-Prolin-hydrazid die Bestimmung von Aktivitäten der DP IV sowohl mit einer manuellen Zweipunktmethode als auch mit einem automatisiertem Verfahren nach dem „flow stream“-Prinzip mit hoher Spezifität und analytischer sowie diagnostischer Sensitivität ermöglicht. Das vorzugsweise eingesetzte Substrat Glycyl-L-Prolin-Hydrazid wird durch DP IV in einem pH-Bereich zwischen 7,0 und 10,0 spezifisch zu: Glycyl-L-Prolin und Hydrazin gespalten. Letzteres wird mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in alkoholisch-saure Lösung zu einem Farbstoff umgesetzt und kolorimetrisch bestimmt. Die Erfindung ist für die theoretische methodische und klinische Enzymologie und für die medizinische Diagnostik und Verlaufsbeobachtung spezieller Krankheiten, wie z. B. bestimmter Krebserkrankungen und Immunmangelsyndrome von Bedeutung.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) in menschlichem und tierischem Untersuchungsmaterial, gekennzeichnet dadurch, daß zur Bestimmung ein Substrat der Formel  $R-Pro-NH-NH_2$ , worin R für eine proteinogene Aminosäure steht, vorzugsweise aber Glycyl-L-Prolin-hydrazid oder L-Alanyl-L-Prolin-hydrazid eingesetzt wird, das durch DP IV in einem pH-Bereich von 7,0–10,0 spezifisch zu R-Pro (R in der obigen Definition), vorzugsweise aber zu Glycyl-L-Prolin bzw. L-Alanyl-L-Prolin und Hydrazin gespalten wird und das enzymatisch freigesetzte Hydrazin mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in alkoholischer salzsaurer Lösung unter gleichzeitigem Abbruch der Enzymreaktion zu einem Farbstoff umgesetzt und kolorimetrisch bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß das entsprechende Substrat der Formel  $R-Pro-NH-NH_2$ , worin R für eine proteinogene Aminosäure, vorzugsweise für Glycin oder L-Alanin, steht, aus  $Y-R-Pro-X$ , worin R wie oben definiert ist, X für eine Estergruppierung, vorzugsweise Methyl-, Ethyl-, Benzyl- oder Phenacyl-ester und Y für Benzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl, Biphenylisopropylloxycarbonyl,  $\alpha, \alpha'$ -Dimethylbenzyloxycarbonyl, o-Nitrophenylsulfenyl oder vorzugsweise tert. Butyloxycarbonyl stehen, aufgebaut, durch Verknüpfung von  $Y-R-OH$  mit  $Pro-X$  nach den in der Peptidchemie üblichen Techniken durch Hydrazinolyse und anschließender acidolytischer oder hydrogenolytischer Abspaltung des Restes Y nach den in der Peptidchemie für diese Aminoschutzgruppen üblichen Deblockierungsbedingungen erhalten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß das jeweils verwendete Substrat in Form eines Salzes, vorzugsweise als Dihydrochlorid eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 und 3, gekennzeichnet dadurch, daß sowohl eine Vorfeld- und Differentialdiagnostik als auch eine Verlaufs- und Therapiekontrolle von Krankheiten, vorzugsweise bestimmter maligner Erkrankungen und Immunschwäche-syndromen, wie z. B. AIDS, nach einem einfachen Verfahren möglich ist.

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung von Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) (Ec 3.4.14.5) in menschlichem und tierischem Untersuchungsmaterial zur Lösung biochemisch-wissenschaftlicher und medizinisch-diagnostischer Aufgaben.

Die Bestimmung von DP IV-Aktivitäten in Körperflüssigkeiten vornehmlich als Marker für T<sub>H</sub>-Lymphozyten gewinnt zunehmend an Bedeutung in der enzymologischen Differentialdiagnostik von Erkrankungen mit lymphozytärer Reaktion und von Immunschwäche-syndromen verschiedener Ätiopathogenese.

Die Anwendung der DP IV in der biochemischen Grundlagenforschung betrifft die Abklärung enzymkinetischer Probleme und die Stellung des Enzyms innerhalb proteolytischer Prozesse unter Freisetzung oder Abbau pharmakologisch und physiologisch aktiver Peptide.

Die Erfindung ist damit für die biochemischen und medizinischen Wissenschaften, für Forschung und medizinische Betreuung, für Diagnostik und Therapiekontrolle von Interesse und Bedeutung.

## Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Bestimmung von Aktivität der Dipeptidylpeptidase IV wurden bisher ausschließlich Methoden auf der Grundlage der Substrate Glycyl-L-Prolin-4-nitroanilid, L-Alanyl-L-Prolin-4-nitroanilid bzw. der entsprechenden  $\beta$ -Naphthylamide und Coumarinamide eingesetzt (M. Harada et al. Biochim. Biophys. Acta 705, 288 [1982], Biochim. Biophys. Acta 576, 280 [1979], K. Imai et al. J. Biochem. [Tokyo] 93, 431 [1983]). Die Verfahren mit Verwendung dieser Substrate haben Nachteile:

- Die Methode unter Verwendung von Gly-Pro-p-nitroanilid besitzt aufgrund des vergleichsweise niedrigen molaren Extinktionskoeffizienten der enzymatisch freigesetzten und zu bestimmenden chromogenen Komponente p-Nitroanilin eine geringe analytische und dadurch bedingte eingeschränkte diagnostische Sensitivität.
- Alle bisherigen Verfahren erfordern Photometer mit kinetischer Registrierung und sind daher aufgrund der damit verbundenen Investitionskosten nicht in allen medizinischen Laboratorien unter ökonomischen Aspekten praktikabel. Dieser Aspekt gewinnt besondere Relevanz bei Einsatz des Verfahrens in der Vorfelddiagnostik.

## Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Entwicklung einer einfachen manuellen bzw. nach dem Fließsystem automatisierbaren und in allen medizinischen Laboratorien praktikablen kolorimetrischen Methode zur einzelnen und massenweisen Bestimmung von Aktivitäten der DP IV in Körperflüssigkeiten zur Früherkennung, Differentialdiagnostik und Verlaufskontrolle von bestimmten Erkrankungen mit Störungen im Immunsystem mit höherer diagnostischer Sensitivität.

Die Erfindung ist vorzugsweise gedacht als Massen-Screening-Verfahren zur enzymologischen Erfassung von Immunmangelsyndromen, insbesondere von Acquired immuno = deficiency syndrome (AIDS). Die Erfindung dient damit der Erfindung von Qualität und Wirksamkeit in der medizinischen Betreuung in ihrer Einheit von Prophylaxe, Diagnostik und Therapie und besitzt damit hohe gesundheitspolitische Bedeutung.

#### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, für die kolorimetrische Bestimmung von DP IV Substrate zu entwickeln, welche mit hoher enzymatischer Spezifität und analytischer und diagnostischer Sensitivität die Ermittlung der Enzymaktivitäten mittels einfacher Methodik unter Verwendung einer photometrischen Grundausstattung in allen medizinischen Laboratorien bzw. mit einem automatisierten Verfahren nach dem „flow-stream“-Prinzip bei Massenuntersuchungen gestattet.

Erfindungsgemäß wird zur Bestimmung der DP IV-Aktivität ein Substrat der Formel I



wobei R für eine proteinogene Aminosäure steht, vorzugsweise aber Glycyl-L-Prolin-hydrazid oder L-Alanyl-L-Prolinhydrazid, eingesetzt.

Ihre Darstellung ist dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der Formel II



worin R für eine proteinogene Aminosäure, vorzugsweise für Glycin- oder L-Alanin, X für eine Estergruppierung bevorzugt Methyl-, Ethyl-, Benzyl- oder Phenacylester und Y für Benzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl, Biphenylisopropoxyloxycarbonyl,  $\alpha, \alpha'$ -Dimethylbenzyloxycarbonyl, o-Nitrophenylsulfenyl oder vorzugsweise für tert. Butyloxycarbonyl stehen durch Verknüpfung von Y-R-OH mit H-Pro-X nach den in der Peptidchemie üblichen Techniken, vorzugsweise nach der Mischanhydrid-Methode mittels Chlorkohlensäureisobutylester aufgebaut, durch Umsetzung mit alkoholischer Hydrazinlösung in Verbindungen der Formel III



mit R und Y in der obigen Definition überführt, aus denen man durch acidolytische oder hydrogenolytische Abspaltung des Restes Y nach den in der Peptidchemie für diese Aminoschutzgruppen üblichen Deblockierungsbedingungen das entsprechende Substrat gemäß Formel I erhält, das vorzugsweise als Salz insbesondere als Dihydrochlorid für die kolorimetrische DP IV-Bestimmung eingesetzt wird.

Das entsprechende erfindungsgemäß dargestellte Substrat entsprechend Formel I zeichnet sich dadurch aus, daß es durch DP IV zu R-Pro (R steht für eine proteinogene Aminosäure), vorzugsweise aber Gly-Pro oder Ala-Pro und Hydrazin in einem pH-Bereich von 7,0 bis 10,0, vorzugsweise zwischen 7,5 und 8,5 gespalten wird, wobei das enzymatisch freigesetzte Hydrazin bei Zugabe von p-Dimethylaminobenzaldehyd in alkoholischer salzsaurer Lösung unter gleichzeitigem Abbruch der Enzymreaktion zu einem orangefarbenen Farbsalz umgesetzt und kolorimetrisch bestimmt wird.

Die bei 455 nm gemessene Extinktion des Farbstoffes ist der DP IV-Aktivität direkt proportional.

#### Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen erläutert.

Abkürzungen für Aminosäure- und Peptidderivate entsprechend IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, J. Biol. Chem. 247, 977 (1972).

##### 1. Darstellung von Glycyl-L-prolin-hydrazid · 2Hydrochlorid

8,8 g tert. Butyloxycarbonyl (Boc)-glycin in 50 ml Tetrahydrofuran werden bei  $-15^\circ\text{C}$  unter Rühren nacheinander mit 6,4 ml N-Methylmorpholin und 6,5 ml Chlorkohlensäureisobutylester versetzt und nach 8 Minuten 6,4 ml N-Methylmorpholin und sofort danach 8,3 g L-Prolin-methylester · hydrochlorid in 30 ml Tetrahydrofuran und einigen Tropfen Wasser hinzugefügt. Der Ansatz wird 1 Stunde bei  $-15^\circ\text{C}$  und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach dampft man das Lösungsmittel i. Vak. ein, löst den Rückstand in Essigester, wäscht nacheinander mit Wasser, gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung, Wasser, 5%iger  $\text{KHSO}_4$ -Lösung und Wasser. Die organische Phase wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und der Essigester i. Vak. verdampft. Es werden 11,2 g Boc-Gly-Pro-methylester erhalten. Der geschützte Dipeptidmethylester wird in 50 ml Ethanol gelöst und mit 10 ml Hydrazinhydrat versetzt.

Nach 24stündigem Stehen bei Raumtemperatur läßt man das Lösungsmittel i. Vak. verdampfen. Das erhaltene Produkt Boc-Gly-Pro-NH-NH<sub>2</sub> wird mit Ether verrieben, abgesaugt, sorgfältig im Hochvakuum über Schwefelsäure getrocknet (Schmp. 183 bis  $187^\circ\text{C}$ ),  $[\alpha]_D^{25} = -63,6^\circ = 0,5$  in Methanol) und zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 120 ml 1,1 n HCl in Essigsäure behandelt. Der Ansatz wird i. Vak. eingeeengt, der Rückstand mit Ether verrieben, abgesaugt und i. Vak. getrocknet.

Ausbeute: 10,7 g (60 % d. Th.)

Schmp. 198–201°C

$[\alpha]_D^{25} = -68,6^\circ = 0,5$  in Methanol

Dünnschichtchromatographisch einheitlich auf Kieselgelfolie Silufol UV<sub>254</sub>, ČSSR, in 1-Butanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser (30:20:6:24), 1-Butanol-Essigsäure-Wasser-Essigester (20:20:20:20) und 2-Butanol-Ameisensäure-Wasser (75:13,5:11,5)

## 2. Kolorimetrische Bestimmung der DP IV-Aktivität

0,500 ml Substrat-Puffer-Gemisch, bestehend aus 16,32 mmol/l Gly-Pro-Hydrazid · 2HCl in Diäthanolamin-HCl-Puffer (200 mmol/l) vom pH 9,1, werden auf 37°C temperiert und mit 0,020 ml Serum für eine Zeit von 15 min inkubiert. Nach der Inkubation werden 5,00 ml Farbreagens, bestehend aus 1 Volumenteil einer Lösung von 4 g Dimethylaminobenzaldehyd in 100 ml 96%igem Ethanol oder Methanol und 17 Volumenteilen 0,1 N Salzsäure, zugegeben und die Ansätze nach 30 min Farbentwicklung bei 455 nm gegen einen Leerwert gemessen.

Dieser Leerwert wird wie folgt behandelt. 0,500 ml des Substrat-Puffer-Gemisches werden 15 min bei 37°C inkubiert, danach mit 5,00 ml Farbreagens und anschließend mit 0,020 ml Serum versetzt.

Aus den Extinktionsdifferenzen wird über einen Hydrazin-Vergleichsansatz oder den molaren Extinktionskoeffizienten die Enzymaktivität in nmol/(s · l) errechnet.

CUSTOMER ORDER DOCUMENT - **THIS IS NOT AN INVOICE** (but may accompany one)

Your invoice will reference **this order by Order Number**, your Docket/Ref#, and date.

Order Number: 123795  
 Order Date: 12/13/1996  
 Customer Docket/Ref: **io246/9000**  
 Shipping mode: 0

ATTN OF: ROBIN PLUMMER  
 WOLF, GREENFIELD & SACKS, PC  
 FEDERAL RESERVE PLAZA, 600 ATLANTIC AVE  
 BOSTON, MA 02210

PHONE: 617-720-3500 FAX: 617-720-2441

(Please notify us if any of the above information is incorrect)

ODB24	5543396	1	3.00
ODB24	5462928	1	3.00
ODB24	5554728	1	3.00
ODB24	5093477	1	3.00
OPT	DD 270382**	1	5.00
OFR	WO 95/29190	1	15.00
OFR	WO 95/15309	1	15.00
OFR	WO 95/12618	1	15.25
OFR	WO 94/28915	1	21.50
OFR	WO 94/03055	1	15.00

Shipping and handling: \$ 43.20

TOTAL COST OF THIS ORDER: \$ 141.95